

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

E. A. P. TECNOLOGÍA MÉDICA

**Antígenos relevantes de Plasmodium vivax y
Plasmodium falciparum detectados mediante
inmunoblot**

Iquitos 2004

TESIS

**para optar el título profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el
área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica**

AUTOR

Jorge Enrique Parraguez de la Cruz

Ricardo Alvaro Santos Salcedo

Lima – Perú

2008

RECONOCIMIENTO ESPECIAL

A los sobresalientes profesionales Biólogos: Omar CACERES REY y Roger CALDERON ESPINOZA por el apoyo, orientación y dedicación en el desarrollo del presente trabajo.

INSTITUCIONES DE SALUD DONDE SE LLEVÓ A CABO EL ESTUDIO

- ◆ LABORATORIO REFERENCIAL REGIONAL DE LORETO
- ◆ INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

DEDICATORIA

A nuestros padres, hermanos y familia por el apoyo y estímulo para el desarrollo del presente estudio, así como por orientarnos hacia la constancia, superación y éxito como filosofía de vida.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra querida asesora por el apoyo incondicional en la realización de la presente investigación, con su espíritu de superación nos impulsó a la culminación de este trabajo, el cual está dedicado a Ud. Muchas gracias.

A la Fundación Miguel Grau, en nombre de su presidente el Contralmte. José Cueto Acervi y su gerente general Cap. (r) César Beltrán Ercilla, por su apoyo económico sin el cual la realización del presente estudio no se hubiese podido llevar a cabo.

Al personal que labora en el Instituto Nacional de Salud y en el Laboratorio Referencial Regional de Loreto por su apoyo desinteresado.

Al personal que labora en los C.S. de Morona Cocha y Bellavista Nanay de la ciudad de Iquitos, por la ayuda brindada y las facilidades para la realización del estudio.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la investigación.

ÍNDICE

	Pág.
I. RESUMEN	01
II. INTRODUCCIÓN	02
III. MATERIAL Y MÉTODOS	07
IV. RESULTADOS	14
V. DISCUSIÓN	27
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
VII. BIBLIOGRAFÍA	32
VIII. ANEXOS	37

I. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue identificar antígenos relevantes de valor diagnóstico de aislados de *P. vivax* y *P. falciparum* provenientes del departamento de Loreto, mediante la técnica de inmunoblot.

Se seleccionaron pacientes entre 3 y 64 años con diagnóstico de malaria, gota gruesa positiva, procedentes de centros de salud en el departamento de Loreto. Fueron analizadas 4 mezclas de antígenos, una de *P. falciparum* (PF1) y tres de *P. vivax* (PV1, PV4 y PV5), preparadas a partir de 36 muestras de pacientes con alta parasitemia por *P. vivax* (2 700 – 69 000 parásitos/ μ L) y *P. falciparum* (2 750 – 10 000 parásitos/ μ L). Las mezclas de antígenos fueron enfrentadas a 39 sueros (12 de *P. falciparum* y 27 de *P. vivax*) mediante ensayos de inmunoblot.

El análisis por inmunoblot reveló un total de 50 bandas antigénicas con masas relativas entre 33 y 218 kDa reconocidas por sueros de pacientes con malaria. Las bandas antigénicas más frecuentes en PF1 fueron de 190, 86, 80, 60 y 121 kDa y las bandas antigénicas de 33, 170, 131, 160, 36, 176, 152, 148, 215, 58, 61, 106, 144 y 218 kDa fueron las más frecuentes en PV1, Pv2 o PV3. Las bandas de 97, 72, 69, 64 y 35 kDa fueron comunes a *P. falciparum* y *P. vivax*. Los sueros de individuos sanos y de los pacientes con otras infecciones no revelaron ninguna banda.

Los datos obtenidos en este estudio demuestran la presencia de bandas antigénicas relevantes del género *Plasmodium* y bandas específicas de *P. vivax* y *P. falciparum*.

Palabras claves: proteínas antigénicas, malaria, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, inmunoblot

II. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa causada por parásitos del género *Plasmodium*. En el mundo se conocen 4 especies que infectan al hombre: *P. vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *P. falciparum* (Welch, 1897), *P. ovale* (Stephens, 1922) y *P. malariae* (Laveran, 1881) (1). La transmisión de *Plasmodium* a los humanos ocurre por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles* infectados con el parásito. Además, el paludismo se puede contagiar a través de las transfusiones de sangre procedentes de un donante infectado o por el uso de agujas hipodérmicas compartidas entre los toxicómanos cuando uno de ellos está infectado. La transmisión transplacentaria, aunque rara, constituye otro mecanismo de contagio.

La malaria es una enfermedad que presenta altas y graves tasas de morbilidad - mortalidad, lo que ocasiona una severa carga económica y social (2). La Organización Mundial de la Salud estima que la malaria afecta a 3 billones de personas, presentándose de 300 a 660 millones de casos anuales (3), siendo la causa de más de 2.7 millones de defunciones al año, presentándose mayoritariamente en niños (4,5), y de este grupo 500 millones de episodios clínicos suceden por año (6,7).

La malaria posee una amplia distribución en África, Asia, América Central y del Sur e islas del Pacífico. En 1999, en la región de las Américas, 299 millones de personas (36,5%) vivían en zonas con condiciones ecológicas propicias para la transmisión de la malaria. De los 35 países y territorios que son miembros de la Organización Panamericana de la Salud, 21 informaron tener zonas con transmisión activa de malaria hasta dicha fecha (8).

En el Perú tenemos 3 especies de *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*, de las cuales las más importantes son *P. vivax*, por el mayor número de casos, y *P. falciparum*, por la severidad en el cuadro de malaria (9,10,11).

En el 2004 el número total de casos de malaria por *P. falciparum* fue de 13 685, y Loreto como departamento registró 9 815 casos (12). En el acumulado del 2007 se reportaron 52 817 casos de malaria, siendo el índice parasitario anual acumulado hasta la semana epidemiológica 52 de 2.30. Sólo en la región amazónica se registraron 42 936 casos, de los cuales 36 942 se presentaron en Loreto, el departamento con la mayor cantidad de casos de esa región, en el cual se reportaron 2 defunciones. El total de casos de malaria por *P. falciparum* fue de 7 766, y sólo Loreto como departamento registró 7 609 casos (13).

Plasmodium presenta un ciclo de vida con dos tipos de reproducción: una

sexual que ocurre en *Anopheles* sp. (hospedero definitivo), y otra asexual que ocurre en el hombre (hospedero intermediario). El periodo de incubación en el hombre depende de la especie que provoca la infección. Si es producida por *P. vivax* suele durar entre 10 y 16 días, y si es producida por *P. falciparum* dura entre 8 y 14 días (14). La malaria se presenta con malestar general, cefalea, cansancio intenso (astenia), molestias abdominales, dolores musculares (mialgias), fiebre y escalofríos.

El diagnóstico de malaria se realiza mediante diferentes técnicas, siendo la gota gruesa, el examen microscópico que permite visualizar parásitos en una muestra de sangre, la prueba de oro para el diagnóstico de la enfermedad (15,16). Un resultado positivo significa el hallazgo de *Plasmodium* y confirma el diagnóstico de malaria. Posee una buena sensibilidad (92-98%) y especificidad (85-99%) (17), alcanzadas en condiciones normales de laboratorio, no siendo así en zonas de difícil acceso a recursos tecnológicos, en las cuales no se cuenta con infraestructura adecuada para mantener insumos y equipos, como ocurre en gran parte de la región amazónica y costa norte de nuestro país. A pesar de su alta sensibilidad para detectar la infección por *Plasmodium*, en algunos pacientes el parásito no puede ser detectado por esta metodología debido a las bajas parasitemias de *P. vivax* o *P. falciparum*; en esta última especie, el secuestro o adherencia parasitaria que presenta incrementa la dificultad en el diagnóstico (18,19). Otro método de diagnóstico es la microscopía de campo oscuro, técnica usada para detectar pigmentos de esquizontes y gametos de *Plasmodium* pero no para su aplicación cotidiana en el diagnóstico de laboratorio, porque se requiere que el personal esté bien capacitado para no confundir estas estructuras con posibles artefactos (20). Otros métodos directos de diagnóstico empleados son: la

microscopía con fluorocromos (14), el método de la capa de leucocitos [Quantitative Buffy Coat-method (QBC®)] (14), las sondas genéticas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (21).

Como en toda infección, frente al agente parasitario se despierta tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral, siendo esta última la responsable de la formación de anticuerpos en el paciente infectado (22,23). La negativización de estos anticuerpos es un proceso largo, lo que dificulta su uso en áreas endémicas para fines de diagnóstico (24). Sin embargo, la medición de anticuerpos puede ser útil en áreas endémicas para medir el grado de endemidad de la malaria, verificar la ausencia o presencia de transmisión, delinear áreas maláricas, detectar la transmisión por razones de migración, determinar la reintroducción de la malaria en áreas de consolidación y de mantenimiento y evaluar programas antimaláricos (14). En áreas no endémicas, la determinación de anticuerpos anti- *Plasmodium* puede ser útil para seleccionar a los donantes de sangre, elucidar casos clínicos indefinidos, evaluar el tratamiento, detectar malaria en personas que regresan de zonas endémicas, descubrir el síndrome del bazo hiperreactivo de malaria (esplenomegalia tropical) y detectar a individuos con formas latentes de la enfermedad (14, 25, 26).

Entre los métodos indirectos que han sido empleados para diagnosticar malaria destacan: la doble difusión en gel de agar (14), el radioinmunoensayo (27), la prueba de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA) (28), la reacción de inhibición del merozoíto, la fijación de complemento, la aglutinación pasiva y directa (29), la inmunofluorescencia indirecta (30,31), y el inmunoblot (32,33).

El inmunoblot es una técnica que permite detectar o identificar antígenos a partir de una mezcla compleja, su uso en inmunología clínica ha permitido

detectar anticuerpos específicos frente a antígenos conocidos, como el antígeno total del quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus* (34) o glicoproteínas del virus respiratorio sincicial (35) entre otros. La capacidad de identificar reactividad a proteínas individuales imparte una gran especificidad a ésta técnica, la cual puede usarse para detectar bandas proteicas específicas de un agente infeccioso, en este caso *Plasmodium*.

Se ha reportado la detección, por electroforesis en gel de poliacrilamida, de proteínas específicas secretadas por los gametocitos de *P. vivax* y *P. falciparum* que estimulan la proliferación de linfocitos, identificándose para *P. falciparum* las proteínas de 118, 62, 52, 33 y 24 kDa, y para *P. vivax* las proteínas de 114, 94, 62, 55, 34 y 24 kDa (36). Asimismo, se han podido aislar antígenos solubles de 33-35 kDa de *P. falciparum* de buena especificidad y antigenicidad (37).

La aplicación de la técnica del inmunoblot para el análisis de preparaciones antigénicas, empleando sueros conteniendo anticuerpos anti – *P. falciparum*, permitió detectar las siguientes bandas proteicas del parásito: 75, 70, 68, 65, 62, 58, 43 y 40 kDa (38). La utilidad del inmunoblot para el diagnóstico de malaria por *P. vivax* se obtuvo al identificar proteínas específicas de especie, las cuales fueron de 60, 58, 56, 48 y 42 kDa (39).

El objetivo del presente estudio fue identificar antígenos relevantes de valor diagnóstico de aislados de *P. vivax* y *P. falciparum* provenientes del departamento de Loreto, provincia de Maynas, distritos de Iquitos, Punchana e Indiana mediante la técnica del inmunoblot.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

La ciudad de Iquitos (73°W , 3°S) está ubicada en el margen izquierdo del río Amazonas, en el punto de unión de los ríos Ucayali y Napo (Figura 1), a 3 646 Km del Océano Atlántico y a 859 Km de la capital peruana. Es la ciudad capital del departamento de Loreto y cuenta con aproximadamente 420 944 habitantes, siendo la ciudad más grande de la amazonía peruana y el principal puerto fluvial del Perú. Posee un clima tropical lluvioso, con temperaturas que van desde los 20°C a 36°C , siendo la media anual de 28°C . En la región amazónica la malaria tiene un patrón epidemiológico inestable y un comportamiento estacional, con un pico entre los meses de marzo a agosto; todos los grupos etarios son afectados y la mayor parte de los casos son sintomáticos (40).

El diseño del estudio fue descriptivo, transversal y prospectivo. El estudio se llevó a cabo entre Marzo y Mayo del 2004 en el departamento de Loreto, provincia de Maynas, en los distritos de Iquitos, Punchana e Indiana. Los establecimientos de salud que participaron con pacientes con diagnóstico de malaria por *P. vivax* o *P. falciparum* fueron: Centro de Salud (C.S.) Bellavista Nanay como cabecera de red y anexos, Puesto de Salud (P.S.) Puerto de Masusa, P.S. Picuroyacu, P.S. Padrecocha, P.S. Centro Fuerte y P.S. Sargento Lores pertenecientes al distrito de Punchana; C.S. Morona Cocha, P.S. Manacamiri y P.S. San José de Lupuna pertenecientes al distrito de Iquitos; y el P.S. de Santa Cecilia del distrito de Indiana.

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Fueron incluidos en el estudio 63 pacientes diagnosticados con malaria por el método de la gota gruesa (16). Los sueros controles negativos se obtuvieron de 11 donantes de banco de sangre de una clínica y hospital de Lima, incluyéndose una muestra de sangre con glóbulos rojos no parasitados como control de glóbulos rojos. Así mismo, para evaluar la especificidad de la prueba se trabajó con sueros de individuos con enfermedad de Chagas (n=1), leishmaniosis (n=1), infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, n=1) y el virus linfotrópico humano (HTLV, n=1).

3.3 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

En los centros de salud escogidos, se explicó a los pacientes con síntomas y signos de malaria sobre los objetivos del trabajo. Una vez obtenida la aceptación y el consentimiento informado del paciente (*Anexos A y B*) se aplicó una encuesta

estructurada (*Anexo C*), la que contenía datos generales, epidemiológicos y preguntas sobre sus antecedentes de malaria, sintomatología de la enfermedad y sobre vacunación.

A cada participante se le extrajo 100 µL de sangre con la cual se realizó una lámina de gota gruesa, según lo establecido por el programa nacional de control de malaria (16).

Tomando en cuenta los resultados de la gota gruesa se incluyó en el estudio a todo paciente con diagnóstico positivo de malaria por *P. vivax* y *P. falciparum* (monoinfección), con parasitemia mayor o igual a 2+ (2 700 – 69,000 parásitos/µL), que residía dentro del área de estudio y que no había viajado fuera de ésta en los últimos 30 días, independientemente del sexo, edad y raza. Se excluyó del estudio a los niños menores de 3 años, a los pacientes con diagnóstico negativo a malaria, aquellos con parasitemia mixta o con diagnóstico de malaria asociada a otras infecciones, con parasitemias menores a 2+, en tratamiento o que no aceptaron participar en el estudio.

A los pacientes seleccionados, se les extrajo 7,0 mL de sangre venosa en tubo al vacío sin anticoagulante y 3,5 mL en tubo al vacío con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron transportadas en cajas térmicas con bloques de hielo hasta el Laboratorio Referencial regional de Loreto para el centrifugado y separación del suero, los cuales se almacenaron a – 20 °C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Malaria en el Instituto Nacional de Salud (INS). Las muestras de sangre con anticoagulante fueron criopreservadas con la solución de Glycerolyte ®, siguiendo el procedimiento descrito por Gutiérrez y Arróspide (16) (*Anexo D*).

3.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS CRIOPRESERVADAS

En el INS, las muestras de sangre criopreservadas fueron recuperadas (16) (*Anexo E*), como paso previo a la extracción antigénica. La lisis de los eritrocitos recuperados se realizó con saponina al 0.04% (38). Las muestras de sangre entera parasitada (*P. vivax* o *P. falciparum*) y no parasitada (control) fueron lavadas tres veces con tampón salino fosfato (PBS) 0.01M, pH 7.2, a 1 500 x *g* por 10 minutos (min) a 4 °C. El sedimento obtenido fue resuspendido en PBS - saponina al 0.04% e incubado a temperatura ambiente por 20 min. El lisado fue centrifugado a 3 000 x *g* por 15 min a 4 °C, el sedimento obtenido se lavó con PBS a 1 500 x *g* por 10 min a 4 °C, se resuspendió en PBS y se almacenó a -70 °C hasta el momento de la extracción antigénica. Para comprobar la presencia de *Plasmodium* post tratamiento de lisis se utilizó la prueba inmunocromatográfica OptiMAL® (16).

3.5 EXTRACCIÓN ANTIGÉNICA

Para la extracción antigénica se siguió el procedimiento descrito previamente por Ávila y cols. (38). En un tubo de ensayo se adicionaron sucesivamente 500 µL de las muestras lisadas, 500 µL de Zwittergent al 1 % (CalbioChem. Co.) conteniendo 10 µL de Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM más 10 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete ROCHE) y, 250 µL de PBS conteniendo 10 µL (PMSF) 1mM y 10 µL de la mezcla de inhibidores de proteasas. La mezcla fue incubada por 20 min a temperatura ambiente y luego centrifugada a 10 000 x *g* por 30 min a 4 °C. El sobrenadante de proteínas obtenido se denominó extracto antigénico soluble (EAS), el cual se almacenó a -70 °C hasta el siguiente procedimiento.

3.6 CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ANTIGÉNICO SOLUBLE

La concentración del contenido de cada *EAS* se realizó por precipitación con acetona. La proporción de *EAS* – solvente fue de 1:2. La mezcla se incubó a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, la mezcla fue centrifugada a 10 000 x *g* a 4 °C por 5 min obteniéndose un sedimento, denominado *EASc*, que se almacenó a -20 °C hasta su liofilización.

3.7 DOSAJE DE PROTEINAS

El contenido proteico del *EASc* fue dosado por el método de Lowry y col. (41) empleándose albúmina sérica bovina (BSA) como estándar (41) (*Anexo F*).

3.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)

Las mezclas de *EASc* de *P. vivax*, *P. falciparum* y los glóbulos rojos no parasitados, fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) (*Anexo G*), siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (42).

Debido a la baja resolución de las bandas proteicas obtenidas, varias variables del procedimiento fueron estudiadas: a) concentración de la muestra: 120, 150, 180 µg ; b) voltaje de corrida del gel de empaquetamiento: 50, 60 y 70 V; c) voltaje de corrida del gel de separación: 120, 140 y 160 V; d) tiempo de corrida: 65, 75 y 85 min; e) tipo de tampón: tampón β-mercaptoetanol (2ME) conteniendo 2ME al 5%, Tris - HCl 6,2 mM, pH 6.8, SDS al 0,2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,001%; y el tampón urea conteniendo urea 1M, Tris – HCl 0,01M, SDS al 1%, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0,001% y 2ME al 5% (38).

Luego de estandarizarse las condiciones de corrida estas fueron las usadas en todo el estudio.

Las muestras fueron diluidas en buffer muestra (v : v), hervidas por tres minutos y aplicadas a un gel de poliacrilamida. La electroforesis fue llevada a cabo hasta que el indicador de corrida alcanzó el extremo del gel de separación. Las siguientes proteínas fueron usadas como marcadores de peso molecular: ovoalbúmina (45 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), beta galactosidasa (116 kDa) y miosina (200 kDa) (Sigma Chem. Co). Al finalizar la electroforesis, los geles fueron teñidos con el colorante azul brillante de Coomassie por aproximadamente 30 min (*Anexo H*), o fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa.

El cálculo de los Rf de las bandas proteicas se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Ávila y cols. (38), haciendo las mediciones directamente sobre el gel o una fotografía del gel.

3.9 INMUNOBLOT

Las fracciones antigénicas separadas por SDS - PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (NC, 0,2 nm de porosidad, GIBCO, BRL/SIGMA), usando un equipo de transferencia (BIORAD) en un sistema semiseco por 2.5 horas a 324 mA , siguiendo el procedimiento descrito por Ávila y cols. (38) con ligeras modificaciones. Se utilizó tampón Tris-glicina (*Anexo I*) como tampón de transferencia. Para determinar la eficacia de la transferencia, la NC conteniendo una parte del antígeno y el estándar de peso molecular fue teñida con tinta china (*Anexo J*).

Se cortaron tiras de nitrocelulosa con las proteínas transferidas de 7 x 4 mm

de ancho y se guardaron entre hojas de papel filtro embebidas en PBS a -20°C hasta su uso. Las tiras fueron bloqueadas con PBS – Tween al 0,05% (PBS-T) conteniendo 1% de leche descremada (PBS-TL) por una 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Luego, se descartó la solución bloqueadora y se lavaron las tiras tres veces con PBS-T. Seguidamente fueron enfrentadas con sueros de los pacientes diluidos 1/50 en PBS y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Las tiras fueron lavadas como antes y se incubaron con anticuerpos anti-IgG humano conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma), diluidos 1:1 000, durante 1 hora con agitación moderada. Luego, las tiras fueron lavadas 2 veces durante 7 minutos con solución de lavado PBS-T, 2 veces con Tampón Salino Tris (TBS) conteniendo Tween al 0,05% (TBS – T) y una vez con TBS (*Anexo K*). Para el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo, la tiras se incubaron en el tampón para la fosfatasa alcalina con 0.03% de nitro azul de tetrazolio, 0.039% de 5 –bromo 4 - cloro 3 - indolil fosfato y N'N'-dimetilformamida. Se detuvo la reacción descartando el sustrato y lavando las tiras de nitrocelulosa con agua bidestilada. Las tiras se colocaron sobre un papel limpio y se dejaron secar a temperatura ambiente en oscuridad.

3.10 ANÁLISIS DE DATOS

Para calcular los pesos moleculares de las bandas reveladas en los inmunoblot, se usó el software TotalLab image analysis solution (Nonlinear Dynamics Ltd). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Fisher.

IV. RESULTADOS

Entre los meses de marzo y mayo del 2004 se eligieron 63 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión provenientes de los establecimientos de salud de tres distritos de la provincia de Maynas, departamento de Loreto. De los 63 pacientes seleccionados, 38 (60,3%) fueron varones, 25 (39,7%) fueron mujeres y tuvieron entre 8 y 64 años (Promedio de: 26.32 ± 15.36); 36 (57,1%) tuvieron diagnóstico de malaria por *P. vivax* y 27 (42,9%) por *P. falciparum*.

Debido a que en ensayos preliminares con los EAS se encontró que el contenido proteico de las muestras era insuficiente para su detección en la primera etapa del inmunoblot, la electroforesis, se decidió agrupar las muestras en mezclas.

Para la formación de mezclas las muestras fueron agrupadas de acuerdo al lugar de procedencia de los pacientes (comunidades y establecimientos de salud

más cercanos a ellos, ubicados en las cuencas de los ríos). Se obtuvieron 5 mezclas de muestras por especie de parásito, provenientes de las cuencas de los ríos Nanay, Ucayali, Momon, Amazonas y Punchana-Picuroyacu (Tabla 1).

De las 10 mezclas en que se agruparon las 63 muestras, sólo se reportan los resultados de 4 mezclas (PF1, PV1, PV4 y PV5), que contenían 36 *EASc* (12 pertenecían a *P. falciparum* y 24 a *P. vivax*), obteniéndose un porcentaje de reporte de las muestras recolectadas de 57,1% (36/63). La concentración de los extractos antigénicos varió entre 2 036 y 3 403 µg /mL (promedio de 2 878 µg /mL) (Tabla 2). Las mezclas que se no se tomaron en cuenta para el estudio fueron PF2, PF3, PF4, PF5, PV2 y PV3. El dosaje de glóbulos rojos no parasitados reveló una baja concentración proteica (3,3 µg /mL), no óptima para una corrida electroforética

La aplicación de la prueba inmunocromatográfica OptiMAL a las muestras lisadas reveló un resultado positivo en todos los casos, lo que revela que todas ellas contenían antígenos del parásito previo a su extracción.

Los mejores resultados de la electroforesis se obtuvieron al emplearse la concentración de 150 µg de *EASc* por canaleta. El tiempo y voltaje óptimo de corrida fueron de 75 min y 140 V, respectivamente. Cuando se compararon los dos tipos de tampón muestra estudiados, se encontró que el tampón 2ME reveló una mejor definición de bandas proteicas y fue por lo tanto elegido para todo el estudio.

Las muestras de sangre con *Plasmodium*, criopreservadas, extraídas, concentradas y agrupadas en mezclas, fueron transferidas a membranas de NC para ser enfrentada con los sueros (12 de *P. falciparum* y 27 de *P. vivax*) pertenecientes a cada mezcla; así como también a 11 sueros controles negativos

y 4 sueros provenientes de infecciones por otros agentes etiológicos.

El inmunoblot reveló un total de 50 bandas antigénicas (*Figuras 2 y 3*), 28 bandas correspondieron a *P. falciparum* y 39 bandas a *P. vivax*, de las cuales 5 (97, 72, 69, 64 y 35 kDa) fueron comunes a *P. falciparum* y a las tres mezclas de *P. vivax* (Tabla 3).

Las bandas antigénicas específicas reveladas en las 3 mezclas de *P. vivax* fueron 22 (*Figuras 2 y 3*) de las cuales las más frecuentes tuvieron los siguientes pesos moleculares: 33, 170, 131, 160, 36, 176, 152, 148, 215, 58, 61, 106, 144 y 218 kDa (Tabla 4).

Asimismo, en *P. vivax* se hallaron bandas antigénicas que identifican a cada mezcla, así PV1 mostró cinco bandas antigénicas de 207, 183, 144, 113 y 90 kDa (Tabla 5), de las cuales la más frecuente fue la de 144 kDa; PV4 reveló sólo la proteína de 82 kDa, detectada en 4 casos, y el PV5 sólo la banda de 126 kDa, revelada en 7 casos.

Las bandas antigénicas que se detectaron únicamente en la mezcla de *P. falciparum* evaluado fueron 11, de las cuales las más frecuentes fueron de 190, 86, 80, 60 y 121 kDa (Tabla 6).

La especificidad del inmunoblot usando las mezclas de *P. vivax* y *P. falciparum* frente a sueros de personas sanas y sueros de personas con otras infecciones fue de 100 %, ninguno reveló una banda reactiva.

Tabla 1. Número de mezclas antigénicas por especie de *Plasmodium* y
cuenca geográfica

Cuenca Geográfica	Comunidades	Mezcla	
		<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>
Río Nanay	Santa María de Nanay	PV1: 1,2,8,9,11,12, 20,23,31,34, 41,42,45	PF1: 37, 48, 49, 51, 52,53,55, 57, 59, 61, 62,63
Río Ucayali	Requena Nauta	PV2: 20	PF2: 24,33
Río Momón	Momón Fuerte Lores Fuerte Santa Rosa	PV3: 19,30,36,43, 60	PF3: 7,18,25,26, 46,47,56,58
Río Amazonas	Mazan Indiana Pevas	PV4: 3,10,15,28, 40	PF4: 13, 44
Río Punchana - Picuroyacu	Santa Cecilia Padrecocha Picuroyacu Puerto Masusa	PV5: 4,14,22,27, 29,32,38,39, 54	PF5: 16

PV : Mezcla de *P. vivax*

PF : Mezcla de *P. falciparum*

Tabla 2. Concentración proteica de las mezclas de muestras de *P. vivax* y *P. falciparum* . Loreto 2004

Mezcla	Concentración proteica (µg/mL)
PV1	2 036,7
PV2	0,0
PV3	1 636,7
PV4	3 170,0
PV5	2 903,3
PF1	3 403,3
PF2	2 603,3
PF3	1 636,7
PF4	70,0
PF5	70,0

PV: mezcla de *P. vivax*

PF: mezcla de *P. falciparum*

Tabla 3. Bandas proteicas detectadas por inmunoblot en mezclas de *Plasmodium* provenientes de pacientes con malaria de la provincia de Maynas, Loreto. 2004.

Banda antigénica (kDa)	Mezcla de <i>P. vivax</i> o <i>P. falciparum</i>				Total de sueros positivos
	PF1	PV1	PV4	PV5	
	Número de sueros positivos				
64	10	11	5	7	33
69	10	10	5	7	32
72	7	10	4	7	28
97	10	7	5	4	26
75	7	12	0	6	25
33	0	10	4	8	22
170	0	10	3	9	22
35	10	3	4	4	21
131	0	13	0	7	20
160	0	11	0	9	20
36	0	11	3	4	18
56	8	0	4	6	18
176	0	10	0	8	18
45	10	0	3	4	17
140	5	11	0	0	16
115	8	0	3	4	15
152	0	11	4	0	15
118	10	4	0	0	14
148	0	8	0	5	13
110	9	0	3	0	12
190	12	0	0	0	12
215	0	4	4	4	12
42	4	0	0	7	11
58	0	0	4	7	11
61	0	0	4	7	11
86	11	0	0	0	11
102	6	5	0	0	11
106	0	0	4	7	11
144	0	11	0	0	11
80	10	0	0	0	10
180	2	0	0	8	10
218	0	4	1	5	10
87	0	0	4	5	9
183	0	9	0	0	9
200	9	0	0	0	9
39	0	0	4	4	8
48	2	0	3	2	7
60	7	0	0	0	7
121	7	0	0	0	7
126	0	0	0	7	7

130	5	0	0	0	5
146	5	0	0	0	5
156	4	0	0	1	5
82	0	0	4	0	4
207	0	4	0	0	4
55	3	0	0	0	3
90	0	3	0	0	3
138	3	0	0	0	3
108	2	0	0	0	2
113	0	2	0	0	2
Total	196	194	82	163	635

PV: mezcla de *P. vivax*

PF: mezcla de *P. falciparum*

Tabla 4. Bandas antigénicas específicas detectadas por inmunoblot en extractos antigénicos de 3 mezclas de *P. vivax* provenientes de pacientes con malaria de la provincia de Maynas, Loreto. 2004.

Banda antigénica (kDa)	Mezclas de <i>P. vivax</i>			Total de sueros positivos
	PV1	PV4	PV5	
	Número de sueros positivos			
33	10	4	8	22
170	10	3	9	22
131	13	0	7	20
160	11	0	9	20
36	11	3	4	18
176	10	0	8	18
152	11	4	0	15
148	8	0	5	13
215	4	4	4	12
58	0	4	7	11
61	0	4	7	11
106	0	4	7	11
144	11	0	0	11
218	4	1	5	10
87	0	4	5	9
183	9	0	0	9
39	0	4	4	8
126	0	0	7	7
82	0	4	0	4
207	4	0	0	4
90	3	0	0	3
113	2	0	0	2

PV: Mezcla de *P. vivax*

Tabla 5. Bandas antigénicas detectadas por inmunoblot en los extractos antigénicos PV1, PV4, PV5 de pacientes con malaria por *P. vivax* de la provincia de Maynas, Loreto. 2004.

Banda antigénica (kDa)	Mezclas de <i>P. vivax</i>			Total de sueros positivos
	PV1	PV4	PV5	
	Numero de sueros positivos			
90	3	0	0	3
113	2	0	0	2
144	11	0	0	11
183	9	0	0	9
207	4	0	0	4

PV: Mezcla de *P. vivax*

Tabla 6. Bandas antigénicas detectadas por inmunoblot en el extracto antigénico PF1 de pacientes con malaria por *P. falciparum* de la provincia de Maynas, Loreto. 2004.

Banda antigénica (kDa)	Mezcla de <i>P. falciparum</i> (PF1)	Total de sueros positivos
	Número de sueros positivos	
55	3	3
60	7	7
80	10	10
86	11	11
108	2	2
121	7	7
130	5	5
138	3	3
146	5	5
190	12	12
200	9	9

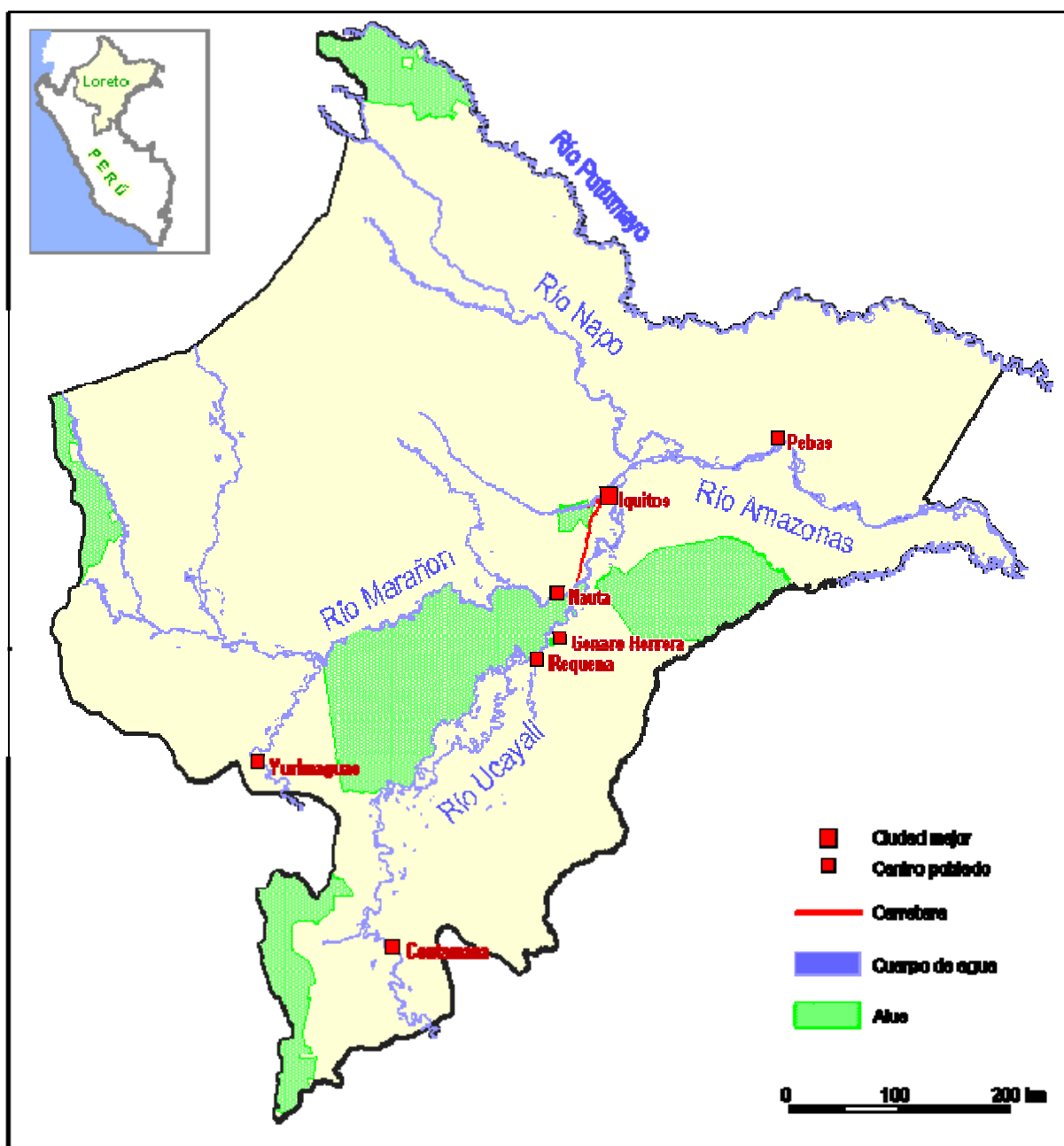
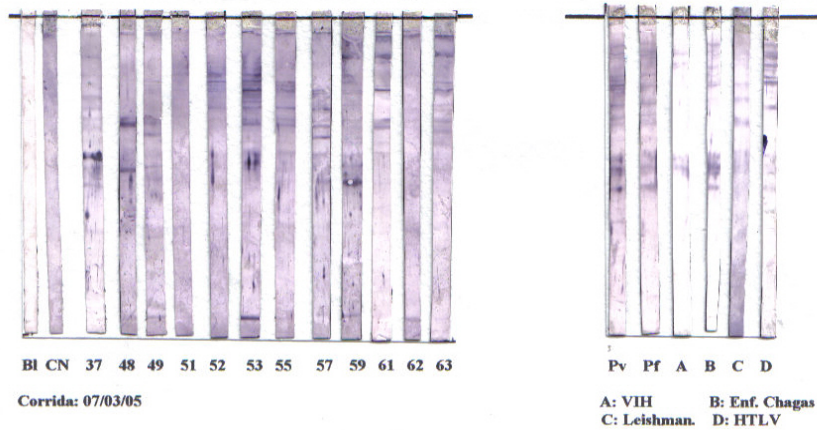


Figura 1. Mapa del departamento de Loreto; lugar donde se realizó el estudio

Plasmodium falciparum

Antígeno **Pf1** (11-14/01/05)

Cuenca: Nanay



Plasmodium vivax

Antígeno **Pv5** (12/01/05)

Cuenca: Punchana - Picuoyacu

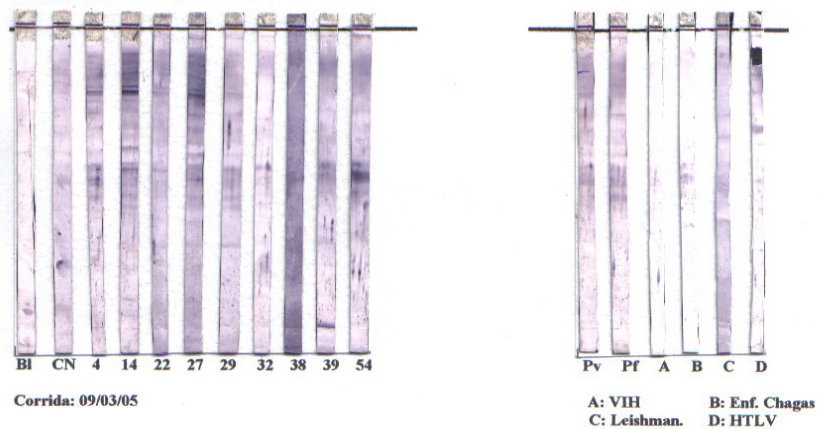
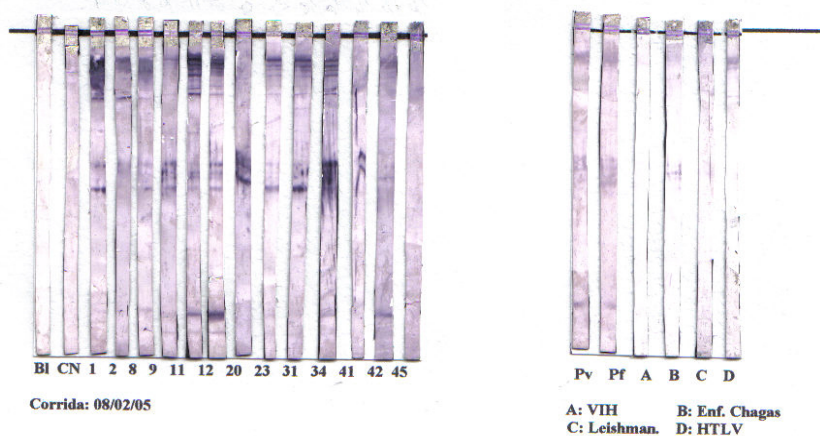
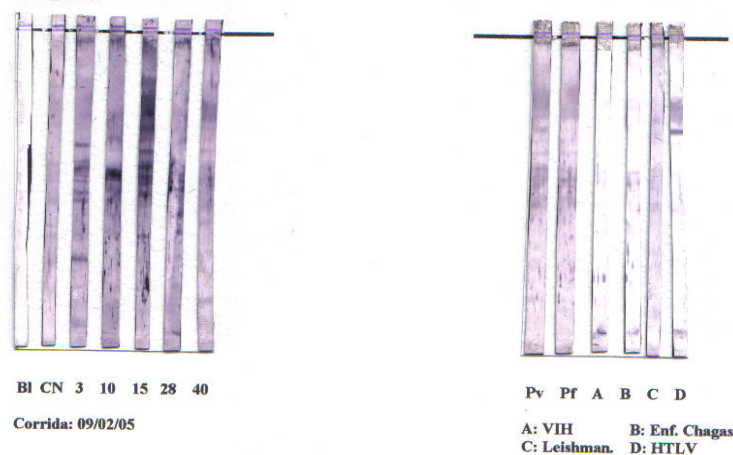


Figura 2. Patrón de reactividad de la prueba de inmunoblot utilizando como antígeno las mezclas PF1 y PV5

Plasmodium vivax
Antígeno Pv1 (12/01/05)
Cuenca: Nanay



Plasmodium vivax
Antígeno Pv4 (12/01/05)
Cuenca: Amazonas



INS – UNMSM

Jorge Parraguez – Ricardo Santos

Figura 3. Patrón de reactividad de la prueba de inmunoblot utilizando como antígeno las mezclas PV1 y PV4.

V. DISCUSION

Para la determinación del perfil antigénico de aislados de *Plasmodium* de origen humano del departamento de Loreto, se obtuvieron los antígenos del parásito a partir de muestras de sangre venosa de pacientes tratada con EDTA, las cuales fueron criopreservadas, a fin de almacenarlas hasta su uso, en tanto que Ávila y cols. obtuvieron los antígenos a partir del cultivo de *P. falciparum* (38), y Sánchez y cols. trabajaron con muestras de sangre entera fresca de *P. vivax* con altos niveles de parasitemia (43). Los niveles de parasitemia de los eritrocitos empleados en nuestro estudio, alrededor de 2 700 – 69,000 parásitos/ μ L fueron similares a los usados por Sánchez y cols. (43).

Inicialmente la electroforesis y el inmunoblot se llevaron a cabo con muestras individuales, eritrocitos humanos parasitados con *P. vivax* y *P. falciparum*, pero debido a la escasa intensidad de las bandas proteicas y antigénicas, decidimos reunir las muestras en mezclas. Este cambio en el diseño del estudio tiene como limitación la formación de mezclas con un número diferente de muestras (Tabla 1), lo que podría originar un sesgo de sobre representación o subrepresentación de algunos epítomos. Para controlar esta limitante hubiese sido necesario cultivar el parásito, con lo cual se hubieran obtenido elevadas parasitemias de las formas maduras, necesarias para el

aislamiento de cantidades suficientes de parásitos y un buen rendimiento proteico después de la extracción antigénica (38).

El uso de 2ME como tampón muestra en la electroforesis reveló bandas proteicas mejor definidas que la electroforesis que emplea como tampón muestra el tampón urea. A diferencia de nuestros hallazgos, Ávila y cols obtuvieron buenos resultados en la resolución de las bandas al emplear el tampón urea (38). Estas diferencias podrían deberse a variaciones en la calidad y contenido proteico de las muestras, y a variaciones en la metodología empleada.

En las 4 mezclas antigénicas evaluadas (PF1, PV1, PV4, PV5), se hallaron 5 bandas antigénicas comunes (97, 72, 69, 64 y 35 kDa), lo que sugiere que son específicas del género *Plasmodium*. Más aún, la frecuencia de estos antígenos fue elevada (Tabla 3). Cuatro de estas bandas han sido reportadas con anterioridad (37, 43, 44). Sánchez y cols. detectaron en aislados de *P. vivax* provenientes de México las proteínas de 72 y 97 kDa (43), Thelu y cols. en Francia reportaron la proteína de 64 kDa en aislados de *P. falciparum* (44); mientras que en Venezuela, Domínguez y Rodríguez detectaron la proteína de 35 kDa en aislados de *P. falciparum* (37). Por lo tanto, la banda de 69 kDa que reportamos podría ser específica de los aislados de la zona de estudio.

Cinco bandas antigénicas (218, 215, 170, 36 y 33 kDa) fueron comunes en las 3 mezclas de *P. vivax*. De ellas, la banda de 170 kDa fue también reportada por Sánchez y cols (43), mientras que la banda de 33 kDa fue detectada por Domínguez y Rodríguez (37), por lo tanto las bandas antigénicas de 36, 215 y 218 kDa constituyen nuevos reportes para la especie y, lo que es importante la banda de 36 kDa tuvo una alta frecuencia, lo que le confiere una utilidad potencial.

De acuerdo al análisis individual para cada uno de las mezclas en PV1 encontramos 5 bandas antigénicas de 90, 113, 144, 183 y 207 kDa no reportadas previamente: la frecuencia e intensidad con que fueron detectadas nos hace suponer que no corresponden a errores de la técnica o a artefactos. Caso contrario ocurre con la mezcla PV4 donde la banda antigénica de 82 kDa se reportó previamente (43). Así mismo, en la mezcla PV5 la banda antigénica de 126 kDa ha sido reportada anteriormente (43).

En relación a *P. falciparum*, de las 11 bandas antigénicas detectadas, 6 de ellas han sido encontradas en estudios previos (38, 43). De estas 6 bandas Ávila y cols. en Brasil hallaron las bandas de 130 y 55 kDa (38), mientras que Thelu y cols. en Francia encontraron las bandas antigénicas de 200, 190 y 86 kDa (44) y en el estudio de Corea realizado por Son y cols. se encontró la banda antigénica de 60 kDa (39). Las restantes 5 bandas antigénicas podrían ser específicas de los aislados de la zona de muestreo, en particular las bandas con mayor frecuencia (80 y 121 kDa).

Los resultados encontrados en este estudio demuestran la presencia de un elevado número de bandas antigénicas en las mezclas de *P. vivax* y *P. falciparum* provenientes de pacientes con malaria de Loreto, mediante el inmunoblot. De estas bandas antigénicas, una (69 kDa) asociada al género *Plasmodium*, una (36 kDa) presente en todos las mezclas de la especie *P. vivax* y una (80 kDa) asociada a la especie *P. falciparum*, podrían estar relacionadas al origen geográfico de los aislados, como se ha reportado previamente (44).

A partir de este estudio se podrían realizar futuras investigaciones con un mayor número de aislados de *P. vivax* y *P. falciparum* para identificar las bandas antigénicas específicas para el género *Plasmodium* y sus especies más

frecuentes en el Perú. La nueva información acerca de la antigenicidad de las proteínas de estas especies causantes de malaria permitirá evaluar su utilidad para fines diagnósticos o como marcadores de inmunidad.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se identificó antígenos relevantes de aislados de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* provenientes del departamento de Loreto, provincia de Maynas, mediante el inmunoblot.
- Cinco bandas antigénicas de 97, 72, 69, 64 y 35 kDa fueron comunes a *P. falciparum* y a las tres mezclas de *P. vivax*.
- Las bandas antigénicas reveladas en las 3 mezclas de *P. vivax* fueron 22, de las cuales las más frecuentes tuvieron los siguientes pesos moleculares: 33, 170, 131, 160, 36, 176, 152, 148, 215, 58, 61, 106, 144 y 218 kDa.
- Las bandas antigénicas que se detectaron únicamente en la mezcla de *P. falciparum* fueron 11, de las cuales las más frecuentes fueron de 190, 86, 80, 60 y 121 kDa.
- En *P. vivax* se hallaron bandas antigénicas que identifican a cada mezcla, así PV1 mostró cinco bandas antigénicas de 207, 183, 144, 113 y 90 kDa, de las cuales la más frecuente fue la de 144 kDa; PV4 reveló sólo la proteína de 82 kDa, y el PV5 sólo la banda de 126 kDa.
- El uso de algunas de estas bandas antigénicas como moléculas indicadoras de infección para malaria debería ser evaluado.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Sherman IW.** Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection. Washington DC: American Society Microbiology Press, 1998.
2. **Organización Panamericana de la Salud.** Normas y Estándares en Epidemiología: Lineamientos para la vigilancia epidemiológica – Paludismo. *Bol Epidemiol* 1999; 20: 11-12.
3. **World Health Organization.** Progress with new malaria vaccines. *Bull World Health Organ* 2003; 81: 902-909.
4. **World Health Organization.** Current global malaria situation. Geneva: WHO; 2000. Technical Report Series No. 892: 2-6.
5. **World Health Organization.** Roll Back Malaria. World Malaria Report 2005. [Sitio en Internet]. Disponible en:
<http://www.globalpolicy.org/socecon/develop/africa/2005/05malariareport.pdf>
f. (Fecha de acceso: Junio 2004).
6. **Hay SW, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW.** The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 327-336.
7. **Snow R, Guerra CA, Noor A, Myint HY, Hay S.** The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005; 434:214-17.
8. **Organización Panamericana de la Salud.** Situación de los Programas de Malaria en las Américas. *Bol Epidemiol* 2001; 1: 10-14.

9. **Aramburu J, Ramal C, Witzig R.** Malaria Reemergence in the Peruvian Amazon Region. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 209-15
10. **Valencia P.** Ensayo de Descripción de la Endemia Palúdica en la Subregión de Piura (Perú) con la ayuda de Técnicas Serológicas y Parasitológicas. *Inst Med Trop Prince Léopold* 1994; 16:18-21.
11. **Náquira C.** Situación Epidemiológica de la Malaria en el Perú Año 1999. *Rev Per Parasitol.* 1999; 14: 102-03.
12. **Perú. Ministerio de Salud - Oficina General de Epidemiología.** *Bol Epidemiol Sem* 2004; 13:2-3.
13. **Perú. Ministerio de Salud - Oficina General de Epidemiología.** *Bol Epidemiol Sem* 2007; 16:3.
14. **López FJ, Schmunis G.** Diagnóstico de la Malaria. *Organización Panamericana de la Salud.* 1988. *Publicación Científica N° 512* .
15. **Turrientes MA y López-Vélez R.** Aspectos Prácticos del Diagnóstico de laboratorio y profilaxis de la malaria. Disponible en : http://www.seimc.org/control/revi_Para/malaria.htm (Fecha de acceso: Junio 2004)
16. **Gutierrez S, Arróspide N.** Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Lima: INS; 2003 Serie de Normas Técnicas N°39.
17. **Anzalone L, Arenas C, Ballesté R, Bazet C y col.** Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. *Departamento de laboratorio clínico. Facultad de Medicina. Hospital de Clínicas. Montevideo- Uruguay.* 2004.

18. **Berendt AR, Fergunson JP, Newblod CI.** Sequestration in *Plasmodium falciparum* Malaria: Sticky Cells and Sticky Problems. *Parasitol Today* 1990; 6: 247-53.
19. **Cooke BM, Wahlgren M, Coppel R.** Falciparum Malaria: Sticking up, Standing out and Out-standing. *Parasitol Today* 2000; 16:416-20.
20. **Jamjoom GA.** Dark-Field Microscopy for Detection of Malaria in Unstained Blood Films. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 717-721.
21. **Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J y col.** Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J Clin Microbiol* 1999;37:3260-3264.
22. **Abbas A, Lichtman A, Pober J.** Inmunología Celular y Molecular. 3ra. edic. España. McGraw-Hill Interamericana. 1998.
23. **Roitt I.** Inmunología Fundamentos. 9na. edic. Argentina. Editorial Médica Panamericana. 1988.
24. **Stites D, Terr A, Parslow T.** Inmunología Básica y Clínica. 9na. edic. México. Editorial El Manual Moderno S.A. 1998.
25. **García J, Álvarez R, Gutiérrez M.** Inmunodiagnóstico de la Malaria en niños. *Rev Mex Patol Clin* 1994; 41: 26-34.
26. **Garuad O, Perraut R, Riveau G, Nutman T.** Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. *Trends in Parasitol* 2003; 19: 300-04.
27. **Avraham H, Golenser J, Bunnag D, Suntharasamai P y col.** Preliminary field trial of a radioimmunoassay for the diagnosis of malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 11-18.

28. **Voller A, Bidwell D, Huldt G, Engvall E.** A microplate method of enzyme – linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull World Health Organ* 1974; 51: 209-211.
29. **Desowitz R, Stein B.** A Tanned red cell haemagglutination test using *Plasmodium berghei* and homologous antisera. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1962; 56:257-262.
30. **Tobie JE, Coatney GR.** Fluorescent antibody staining of human malaria parasites. *Exp Parasitol* 1961; 11: 128-32.
31. **Kuvin SF, Tobie JE, Evans CB, Coatney GR y col.** Fluorescent antibody studies on the course of antibody production and serum gammaglobulin levels in normal volunteers infected with human and simian malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1962; 11: 429-36.
32. **Margni R.** Inmunología e Inmunoquímica. 5ta. edic. Argentina Editorial Médica Panamericana.1996.
33. **Sánchez EL, Náquira C, Vega ES.** Manual de procedimientos para el diagnóstico de las zoonosis parasitarias. Lima: INS; 2002 Serie de Normas Técnicas N°32.
34. **Sánchez EL.** Determinação de antígenos relevantes da forma larvar do *Echinococcus granulosus*: Padronização e Aplicação do “Inmunoblot” no diagnóstico da hidatidose humana (Tesis). Río de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz, 1995.
35. **Parra B, Borrero I, García F.** Caracterización de las glicoproteínas de una cepa de virus respiratorio sincicial aisladas en Cali. *Colombia Med* 1997; 28: 71-6.

36. **Ramsey JM, Tello A, Contreras CO, Ordóñez R y col.** *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* gametocyte-specific exoantigens stimulate proliferation of TCR gd+ lymphocytes. *J Parasitol* 2002; 88:59-68.
37. **Dominguez N, Rodriguez A.** A 33 - 35 kDa circulating antigen from *Plasmodium falciparum*. *Fol Parasitol* 2000; 47: 267-272.
38. **Avila S, Tozetto-Mendoza T, Arruk V, Ferreira AW.** Standardization of Procedures of *Plasmodium falciparum* Antigen Preparation for serologic Test. *Rev Inst Med Trop S Paulo* .1998; 40 : 309-316.
39. **Son ES, Kim TS, Nam HW.** Western blot diagnosis of vivax malaria with multiple stage-specific antigens of the parasite. *Korean J Parasitol* 2001; 39: 171-76.
40. **Roshanravan B. Kari E, Gilman RH, Cabrera L y col.** Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 45-52.
41. **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr A L, Randall UL.** Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
42. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
43. **Sanchez MR, Ramirez JA, Rodriguez M, O'Reilly F y col.** Antibody Response to *Plasmodium vivax* antigens in Human malaria *J Clin Microbiol* 1994; 50: 329-38.
44. **Thelu J, Sheick – Zakiuddin I, Boudin C, Peyron F y col.** Development of Natural Immunity in *Plasmodium falciparum* Malaria : Study of Antibody Response by Western Immunoblotting. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 510-518.

ANEXOS

ANEXO A

CONSENTIMIENTO INFORMADO

(mayores de 18 años)

“ANTIGENOS RELEVANTES DE *Plasmodium* DETECTADOS POR INMUNOBLOT. IQUITOS 2004”

Parraguez De La Cruz, Jorge E. y Santos Salcedo, Ricardo A.**

* Tesistas de la E.A.P Tecnología Médica, Área de Laboratorio Clínico y Anatomía
Patológica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Telef. 99234898 - 99369018

Estimado Señor(a) :

Esta investigación esta respaldada por el Instituto Nacional de Salud, es un estudio que tiene por finalidad evaluar un método de laboratorio que nos ayude en una enfermedad muy cercana a nosotros como la malaria. Para realizarlo se necesitará de 90 personas voluntarias.

El desarrollo del mismo ayudará a encontrar los elementos necesarios para ampliar el estudio de la malaria mediante el Inmunoblot, prueba que usa una parte de tú sangre para poder observar bandas en tiras de papel especial, lo cual proporcionará datos importantes para el beneficio de la salud pública, en la cual tú te beneficiarás también, por ello tú participación es muy valiosa.

Si aceptas *participar voluntariamente* en este estudio se te tomará una muestra de sangre del brazo a la altura del codo, por lo que sentirás un pinchazo que se refleja en un ligero dolor en ese lugar pero sin ningún daño de consideración para tú salud, por lo que no estás obligado a hacerlo; la cantidad extraída es aproximada de 8 mL de sangre para dos tubos, lo cual servirá para las pruebas a realizar en esta y en posteriores investigaciones pero solo con tú respectivo consentimiento.

Si estas de acuerdo y deseas participar entonces puedes manifestar tu consentimiento voluntariamente mediante la firma o rúbrica, por lo que te garantizamos la total confidencialidad de tus datos brindados.

Cualquier duda o incomodidad comunicarla a las personas encargadas del estudio o a la Lic. TM. Maritza Puray Telef. 97651785. Si se presenta algún daño

relacionado contigo en el estudio comunicarlo al Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud, cuyo teléfono es (051-1)471 9920 Anexo 162.

Muchas Gracias

Nombre y apellidos

DNI

Firma

Fecha

Huella digital

C.S. Moronacocha, C.S. Bellavista (Subrayar)

Nombre del Entrevistador

DNI

ANEXO B

CONSENTIMIENTO INFORMADO (menores de 18 años)

“ANTIGENOS RELEVANTES DE *Plasmodium* DETECTADOS POR INMUNOBLOT. IQUITOS 2004”

Parraguez De La Cruz, Jorge E. y Santos Salcedo, Ricardo A.**

* Tesisistas de la E.A.P Tecnología Médica, Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Telef. 99234898 - 99369018

Hola amigo (a):

Esta investigación esta respaldada por el Instituto Nacional de Salud, es un trabajo que busca evaluar un nuevo método de laboratorio que nos ayude en una enfermedad muy cerca de ti como la malaria Para realizarlo necesitamos de 90 personas como tú.

El desarrollo del mismo ayudará a encontrar los elementos necesarios para ampliar el estudio de la malaria mediante el Inmunoblot, prueba que usa una parte de tú sangre para poder observar bandas en tiras de papel especial, lo cual proporcionará datos importantes para el beneficio de la salud de todas las personas que te rodean y la tuya, por ello tú participación es muy valiosa e importante.

Si deseas *participar voluntariamente* en este estudio se te sacará sangre de tu brazo a la altura de tú codo, por lo que sentirás un hincón que te va a ocasionar un dolor pero sin ningún daño para tú salud , esta cantidad de sangre es aproximadamente 8 mL de sangre (enseñar los dos tubos), lo cual servirá para que se realicen las pruebas en este estudio y en otros solamente si tú aceptas.

Si estas de acuerdo y deseas participar entonces puedes darnos tú aceptación voluntaria mediante tú firma o rubrica y tú huella digital, además tu padre o apoderado en caso de que este de acuerdo que tú participes, también tiene que dar su aceptación mediante su firma y huella digital , por lo que les garantizamos no decir a nadie sobre tus datos y resultados.

Cualquier duda o incomodidad comunícale a las personas encargadas del estudio o a la Lic. TM. Maritza Puray Telef. 97651785. Si se presenta algún daño

relacionado con tu participación en el estudio comunícate al Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud, cuyo teléfono es (051-1)471 9920 Anexo 162.

Muchas Gracias

Paciente

Nombre y apellidos

Firma

Huella digital

Padre o apoderado

Nombre y apellidos

DNI

Firma

Fecha

Huella digital

C.S. Moronacocha, C.S. Bellavista (Subrayar)

Nombre del Entrevistador

DNI

ANEXO C

N°-----

FICHA EPIDEMIOLOGICA

FICHA PARA EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Fecha:-----

1.DATOS DE LA INSTITUCIÓN

ESTABLECIMIENTO DE SALUD

DIRECCIÓN_____TELEFONO_____

2.DATOS PERSONALES DEL PACIENTE

APELLIDO PATERNO APELLIDO MATERNO NOMBRES

EDAD :_____ SEXO _____ OCUPACIÓN _____

ESTADO CIVIL: _____

DIRECCIÓN:

DISTRITO : _____ PROVINCIA : _____ DEPARTAMENTO : _____

FECHA DE INICIO DE SÍNTOMAS : _____

FECHA DE OBTENCIÓN DE MUESTRA : _____

DIAGNOSTICO PRESUNTIVO : _____

3. SINTOMATOLOGÍA

___ FIEBRE	___ ICTERICIA	___ ERUPCION DERMICA
___ ESCALOFRIOS	___ MIALGIA	___ COMPROMISO SENSORIAL
___ CEFALEA	___ HEMORRAGIA	___ DOLOR ARTICULAR
___ SUDORACIÓN	___ VOMITO	___ DOLOR ABDOMINAL
___ PALIDEZ	___ ESPLENOMEGALIA	___ HEPATOMEGALIA

OTROS: _____

4. ANTECEDENTES DE MALARIA

TUVO MALARIA? _____ N° DE VECES: _____

FECHA DEL ÚLTIMO EPISODIO: _____

MEDICAMENTOS QUE TOMO EN EL ÚLTIMO EPISODIO:

Cloroquina () Primaquina () Sulfadoxina + Pirimetamina ()

Otras: _____

5. INMUNIZACIONES

FIEBRE AMARILLA _____ FECHA DE ULTIMA DOSIS : _____

HEPATITIS _____ FECHA DE ULTIMA DOSIS : _____

OTRAS : _____ FECHA DE ULTIMA DOSIS : _____

6. ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS

Viaje en los últimos treinta días/lugares)

LUGAR DE DESTINO: _____

TIEMPO DE PERMANENCIA: _____

ANEXO D

CRIOPRESERVACIÓN O CONGELAMIENTO DE LOS PARÁSITOS

Las muestras de sangre entera de los individuos parasitados con *Plasmodium*, obtenidas con anticoagulante, fueron criopreservadas utilizando la solución Glycerolyte 57 BAXTER Fenwal (16).

Procedimiento

1. Centrifugar las muestras de sangre entera a 1 500 rpm por 5 minutos.
2. En cámara de flujo laminar, descartar el sobrenadante y medir el volumen del sedimento.
3. Añadir 0,5 volúmenes de la solución criopreservante gota a gota, por cada volumen del sedimento.
4. Equilibrar la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Transferir con una pipeta estéril la muestra a tubos para criopreservación rotulados correctamente con el código de la muestra, procedencia y la fecha de criopreservación.
6. Guardar los tubos dentro de una caja portacrioviales y almacenar a - 70 °C, hasta su uso.

ANEXO E

DESCONGELAMIENTO DE LAS CEPAS DE *Plasmodium*

Se utilizó el procedimiento descrito por Gutiérrez y Arróspide (16).

Procedimiento:

1. Introducir la muestra en baño María a 37 °C hasta su descongelamiento, aproximadamente 5 – 10 min.
2. Medir el volumen de la muestra y colocar en un tubo de centrifuga de 15 mL.
3. Agregar gota a gota 0,9 mL de cloruro de sodio al 12 % por cada mililitro de la muestra, mezclar suavemente y equilibrar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Agregar gota a gota, 6,2 mL de cloruro de sodio al 1,6% por cada mililitro de la mezcla anterior. Mezclar suavemente.
5. Centrifugar a 1 500 rpm por 5 minutos.
6. Descartar el sobrenadante con una pipeta estéril.
7. Lavar nuevamente el sedimento con cloruro de sodio al 1,6% de la manera descrita anteriormente.
8. Descartar el sobrenadante con una pipeta estéril.

El sedimento queda listo para iniciar la lisis de glóbulos rojos, y posteriormente la extracción antigénica.

ANEXO F

DOSAJE DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY Y COL. (55)

ESTÁNDAR : BSA 1 mg/mL

REACTIVOS

- ❖ **Solución A** : Sulfato de Cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en H_2O
- ❖ **Solución B** : Tartrato de Na y K al 2% en H_2O
- ❖ **Solución C** : Carbonato de calcio al 2% en NaOH 0.1 N
- ❖ **Folin** : Diluido 1/3 en agua destilada.

Mezclar las soluciones de la siguiente manera:

1 vol. Sol A + 1 vol. Sol B + 100 vol. Sol C (Mezcla 1)

PROCEDIMIENTO

1. Elaboración de la curva de referencia.- Se lleva a cabo utilizando el estándar de acuerdo al siguiente protocolo:

TUBOS	B	1	2	3	4	5	6	7
PBS (μL)	1000	990	980	950	900	850	800	750
BSA 1mg/mL(μL)	0	10	20	50	100	150	200	250
[] ($\mu\text{g/mL}$)	0	10	20	50	100	150	200	250

2. Medición del contenido de la muestra problema:

- 2.1 Mezcla 0.4 mL de la muestra con 2 mL de la MEZCLA 1
- 2.2 Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 2.3 Adicionar 0.2 mL de reactivo de Folin (1/3).
- 2.4 Incubar por 30 min a temperatura ambiente.
- 2.5 Leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm.

ANEXO G

COMPOSICIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA USADOS EN LA ELECTROFORESIS (38)

Solución	Gel	
	Empaquetamiento 5%	Separación 10%
• Solución stock de poliacrilamida	0.68 mL	2,67 mL
• Buffer del gel inferior o de separación (Tris 1M, pH 8.8)	-	3.73 mL
• Buffer del gel superior o de empaquetamiento (Tris 1M pH 6.8)	0.52 mL	-
• SDS al 10%	40 µL	100 µL
• Agua desionizada	2,76 mL	3,5 mL
• Persulfato de amonio al 10%	20 µL	50 µL
• Temed	4 µL	10 µL

ANEXO H

COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN COLORANTE AZUL DE COOMASSIE

Solución Colorante

Azul Brillante de Coomassie R-250	0.625 g
Metanol	100 mL
Ácido acético glacial	17.5 mL
Agua bidestilada c.s.p	250 mL

Esta solución es reutilizable. Guardar en frasco oscuro a temperatura ambiente.

ANEXO I

TAMPON DE TRANSFERENCIA TRIS - GLICINA

La composición del tampón de transferencia(38) es la siguiente:

- ❖ 25 mM Tris, 192 mM Glicina, (20% Metanol) pH 8.3

La preparación del tampón se realiza de la siguiente manera:

- Disolver 3,03 g. De Tris y 14,4 g de glicina en 500 mL de agua bidestilada, agregar 200 mL de metanol y ajustar el volumen a un litro con agua bidestilada.

ANEXO J

TINTA CHINA PARA TEÑIR MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

COMPOSICIÓN:

PBS	10 mL
Tween 20	0,03 mL
Tinta China	0,1 mL

PROCEDIMIENTO:

1. Disolver 0,03 mL de Tween 20 en 10 mL de PBS.
2. Añadir 0,1 mL de tinta China a la muestra anterior.

COLORACIÓN:

1. Verter el colorante en la placa petri y añadir la tira de nitrocelulosa a teñir.
2. Colorear por 8 minutos.
3. Retirar la tira de nitrocelulosa de la solución colorante y colocar en una placa petri vacía.
4. Añadir a la placa petri agua corriente. Hacer 2 – 3 cambios del agua para completar la decoloración de la tira.

ANEXO K

PREPARACIÓN DEL TAMPON SALINO TRIS (TBS) 10X

COMPOSICIÓN:

Tris 1 M pH 7,5	200 mM.
NaCl 4 M	1,5 mL
Agua bidestilada csp	500 mL

PREPARACIÓN:

Para preparar TBS-Tween 20 (TBS-T) se mezcla:

TBS 1x	100 mL
Tween 20	0,05 mL

Almacenar a 4 °C hasta por 2 –4 semanas.